

Kemisk analys av toxiner

MSB ANSLAG 2:4 KRISBEREDSKAP

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING



Titel: Kemisk analys av toxiner

Utgiven av: C-nätverket

Upplaga: 400 exemplar

Textredigering och grafisk form: My Laurell AB

Omslagsfoto: Deltagare i C-nätverkets toxinworkshop vid SVA. Foto SVA

Tryck: TMG Taberg

Innehåll

Definitioner och förkortningar	2
Sammanfattning	3
Bakgrund och syfte	4
Botulinumtoxin, Statens veterinärmedicinska anstalt, SVA	6
Botulinumtoxin, saxitoxin, mjältbrandstoxin, Totalförsvarets forskningsinstitut, FOI	8
Enterotoxin, cereulid, Statens livsmedelsverk	10
Cannabinoider, katinoner, Statens kriminaltekniska laboratorium, SKL	12
Flexibla analysmetoder för droger, Rättsmedicinalverket, RMV	14
Kontaktuppgifter	16

DEFINITIONER OCH FÖRKORTNINGAR

CBRN: Kemiska (C), biologiska (B), radiologiska (R) och nukleära (N) ämnen

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, USA:s motsvarighet till Folkhälsomyndigheten

C-nätverket: Nätverk för kemiska analyser vid kris

Endopep-MS: Masspektrometrisk metod för att detektera och särskilja serotyper av botulinumtoxiner där toxiner-
nas enzymatiska egenskaper används.

Enterotoxin: Värmestabila matförgiftningsframkallande gifter som bildas av bakterien *Staphylococcus aureus*

EQuATox: Ett internationellt nätverk där nio framstående laboratorier ingår. Nätverket organiserar EU-täckande kompetenstest för toxinanalyser. Testerna genomförs vid 32 laboratorier i 20 olika länder.

LC-MS/MS: En förkortning av analysmetoden för vätskekromatografi tandem-masspektrometri

MS: Masspektrometri, instrument för identifierande analys genom att molekyler bestrålas med elektroner som gör att de faller sönder i mindre beståndsdelar vilka ofta ger unika mönster

MSB: Myndigheten för samhällsskydd och beredskap

Toxin: Ett giftigt ämne som kan tillverkas av/bildas i levande organismer

UHPLC-QTOF MS: En förkortning av analysmetoden för högupplösande vätskekromatografi, Quadrupole Time-of-Flight tandem MS

Zoonos: Infektion som kan smitta mellan djur och människa

Foto: Annika Tevell Åberg, SVA

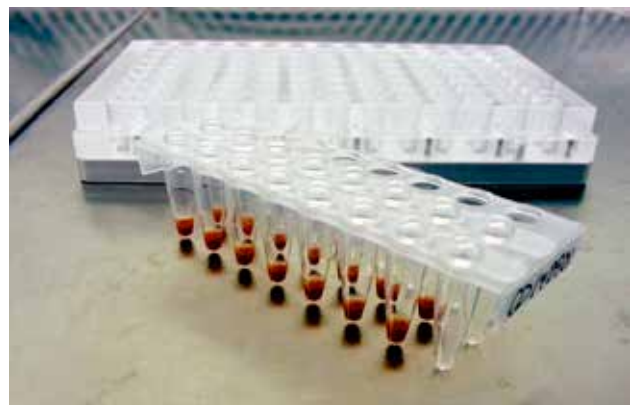




Foto: Ulf Bondesson, SVA

Projekt *Kemisk analys av toxiner* har kraftigt bidragit till att stärka den svenska beredskapen för att hantera kriser där toxiner eller syntetiska varianter av växtdroger är inblandade.

Sammanfattning

Många toxiner, det vill säga gifter som produceras av levande organismer, har mycket hög giftverkan. Trots det har tekniker för att snabbt identifiera dessa ämnen i låga koncentrationer varit mindre väl utvecklade.

Syftet med projektet **Kemisk analys av toxiner** har varit att ta fram moderna analysmetoder baserade på masspektrometri för de mycket giftiga ämnena botulinumtoxin, mjältbrandstoxin, saxitoxin, stafylokok enterotoxin B och cereulid, samt för syntetiska varianter av växtdrogerna cannabiol och katinon.

Arbetet har finansierats via MSB:s anslag för krisberedskap eftersom de här ämnena kan användas i samband med brottslighet/biologisk krigsföring eller på andra sätt bidra till att kritiska situationer uppstår genom att många människor drabbas av förgiftning.

Naturlig förekomst av toxinerna i livsmedel kan ge upphov till akut livsmedelsförgiftning. Syntetiska can-

nabinoider eller katinoner kan orsaka akut förgiftning i samband med drogintag. Det finns med andra ord starka skäl för att utveckla snabba och säkra analysmetoder.

Projektet har genomförts som fristående delprojekt vid Statens veterinärmedicinska anstalt, Totalförsvarets forskningsinstitut, Livsmedelsverket, Statens kriminaltekniska laboratorium och Rättsmedicinalverket, men samordnats av ett nätverk för kemiska analyser vid kris, C-nätverket, där alla myndigheterna ingår.

Arbetet har resulterat i att svensk krisberedskap har skärpts. Den gemensamma förmågan att identifiera extremt giftiga och svåranalyserade ämnen/ämnesgrupper har förbättrats kraftigt.

Nya och förbättrade analysmetoder har tagits fram och samverkan har stärkts på ett sätt som underlättar ett gemensamt, framtida utnyttjande av laboratorieresurser vid krishändelser.

Bakgrund och syfte

Ett kontinuerligt arbete med att utveckla och upprätthålla hög beredskap för att förebygga och hantera samhällskriser pågår. Krisberedskapen i det svenska samhället innefattar många olika områden och aktörer.

Det MSB-finansierade projektet Kemisk analys av toxiner har genomförts för att utveckla samhällets förmåga att hantera händelser med giftiga ämnen, så kallade CBRN-händelser. De är sällsynta, men kan ha mycket stor inverkan på samhället när de inträffar.

Projektet har under en treårsperiod arbetat med att förbättra kunskaperna om farliga toxiner och myndigheternas förmåga att utföra kemiska analyser av dessa och några syntetiska varianter. Bakgrunden är att några av de mest giftiga, nu kända ämnena, hör till kategorin toxiner, ett samlingsnamn för gifter som produceras av levande organismer, till exempel bakterier, alger, svampar, växter eller djur.

Toxiner med mycket hög giftighet representerar ett potentiellt hot. Trots detta har det funnits brister i de svenska myndigheternas förmåga att upptäcka dem. En delförklaring kan vara att förekomsten av naturliga toxiner inte regleras i lag i samma utsträckning som industriellt framställda kemiska ämnen.

Inom projektet Kemisk analys av toxiner har Statens veterinärmedicinska anstalt, Totalförsvarets forskningsinstitut, Livsmedelsverket, Statens kriminaltekniska laboratorium och Rättsmedicinalverket aktivt samverkat för att förbättra kunskaperna om farliga toxiner och

respektive myndighets förmåga att utföra kemiska analyser av dessa. Projektet har varit inriktat på de högprioriterade, giftiga ämnena botulinumtoxin, saxitoxin, enterotoxiner, cereulid, mjältbrandstoxin (antraxtoxiner) samt syntetiska cannabinoider och katinoner.

Sofistikerade kemiska analysmetoder krävs för att hitta och identifiera dessa toxiner och relaterade substanser. För att skapa en resurseffektiv och god laboratorieberedskap behövs också en samverkan mellan olika svenska myndigheter, så att befintlig kompetens och instrumentell utrustning kan utnyttjas gemensamt vid behov.

GEMENSAMT PROJEKTMÅL

Målet för projektet var att ta fram moderna analysmetoder baserade på mättekniken masspektrometri (MS) för flera mycket giftiga och ur ett CBRN-perspektiv viktiga bakterietoxiner och syntetiska varianter av växttoxiner (droger).

Syftet med myndighetssamarbetet var att skapa den kritiska massa av kompetens som krävs för att utveckla kemiska analysmetoder för dessa extremt svåranalyserade ämnen och hitta de bästa lösningarna för enskilda analytiska och laborativa frågeställningar.

GENOMFÖRANDE

Arbetet inom Kemisk analys av toxiner har under en treårsperiod bedrivits som fristående delprojekt på respektive myndighet, med finansiering från anslaget 2:4 Krisberedskap. Samarbetet mellan deltagarna har samordnats av C-nätverket som har

organiserat arbetsmöten inklusive studiebesök och gästföreläsningar med inbjudna experter inom kompetensområdet. Det sammantagna arbetet inom C-nätverksprojektet kommer att redovisas i en fristående rapport.

RESULTAT OCH NYTTA

Myndigheterna som deltagit i projektet har träffats fyra gånger per år för arbetsmöten kring olika teman inom analytisk kemi, med syfte att höja kompetensen inom gruppen. Vid dessa möten har respektive myndigheter också redovisat sina pågående projekt.

Diskussionerna inom expertgruppen har varit en viktig faktor för delprojektens utveckling. Den gemensamma kompetensbasen har också varit en nyckel till framgång. I ett flertal av projekten har ny teknik i form av högupplösande masspektrometri tillämpats för att lösa de kemiska analysfrågeställningarna.

Genom toxinprojektets arbete har en ökad nationell förmåga att hantera krishändelser som involverar toxiner och syntetiska cannabinoider och katinoner uppnåtts. Den gemensamma förmågan att identifiera extremt toxiska och svåranalyserade ämnen/ämnesgrupper har därmed kraftigt förbättrats. Detta redovisas mer i detalj i de följande avsnitten där myndigheterna berättar om resultaten inom sina ansvarsområden.

Projektsamarbetet har gett förbättrade förutsättningar för kunskapsöverföring och gemensamt utnyttjande av laboratorieresurser vid krishändelser och därmed en stärkt krisberedskap. Myndigheterna

har under projektperioden deltagit i laboratoriejämförelser för saxitoxin, botulinumtoxin och stafylokock enterotoxin B, inom EU-projektet EQuATox (www.equatox.net).

C-nätverket har också administrerat och sänt ut ett antal laborativa tester till myndigheterna. Prover med okänt innehåll har skickats ut och syftet har varit att skapa en bild av myndigheternas laborativa analysförmåga med befintliga resurser. Detta har resulterat i en ökad medvetenhet om den egna förmågan att identifiera/hantera olika typer av gifter och provmaterial, men också en ökad medvetenhet om övriga myndigheters förmåga.

SLUTSATSER

Projektet har varit framgångsrikt och gett en god förstärkning av svensk krisberedskap. Arbetet i nätverket har varit en nyckel till att lösa många analysfrågeställningar. Genom nätverket har delprojekten som drivits vid de enskilda myndigheterna fått tillgång till en större, samlad kompetens. Arbetet har resulterat i att nya och förbättrade analysmetoder tagits fram för särskilt giftiga toxiner och relaterade substanser som är intressanta ur ett CBRN-perspektiv.

FAKTA - MASSPEKTROMETRI

Masspektrometri, MS, är en teknik som kan analysera olika kemiska ämnen vid mycket låga koncentrationer.

Varje substans ger upphov till ett specifikt masspektrum som speglar den kemiska sammansättning. Masspektret kan användas för att identifiera ämnet på samma sätt som fingeravtryck används inom kriminaltekniken.

Metoden bygger på att ämnens vikt bestäms med hög noggrannhet. Man kan också slå sönder molekylerna i mindre delar (fragment) vars enskilda vikter också kan bestämmas. De olika fragmentens vikter visas i ett masspektrum som är specifikt för ett visst ämne.

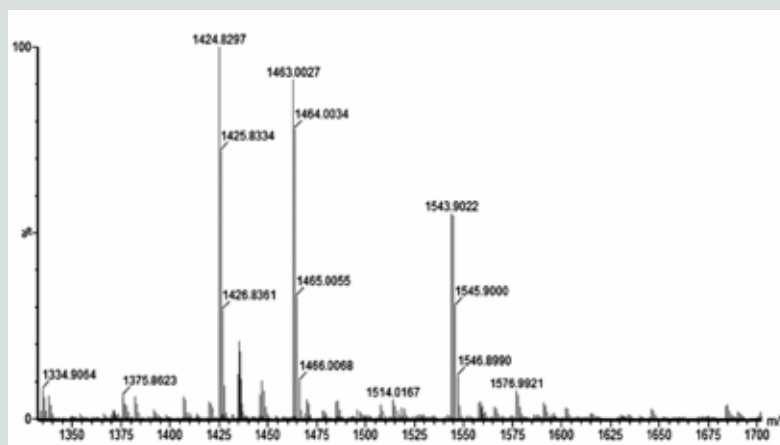
Masspektrum för kända ämnen finns ofta samlade i datorbibliotek. Biblioteken används för att

ge ett snabbt svar på vilka ämnen som förekommer i ett analyserat prov. Dessa bibliotek kompletteras och växer allt eftersom nya ämnen identifieras.

Det finns flera olika masspektrometriska tekniker. De har utvecklats för att det ska gå att få fram tillräcklig

information för att få ett analysbesked för prover från olika typer av provmaterial.

Eftersom många toxiner är giftiga även i mycket låga koncentrationer öppnar MS nya möjligheter att utföra snabba och säkra analyser



Masspektrum av klyvningsprodukter för botulinumtoxin D/C.

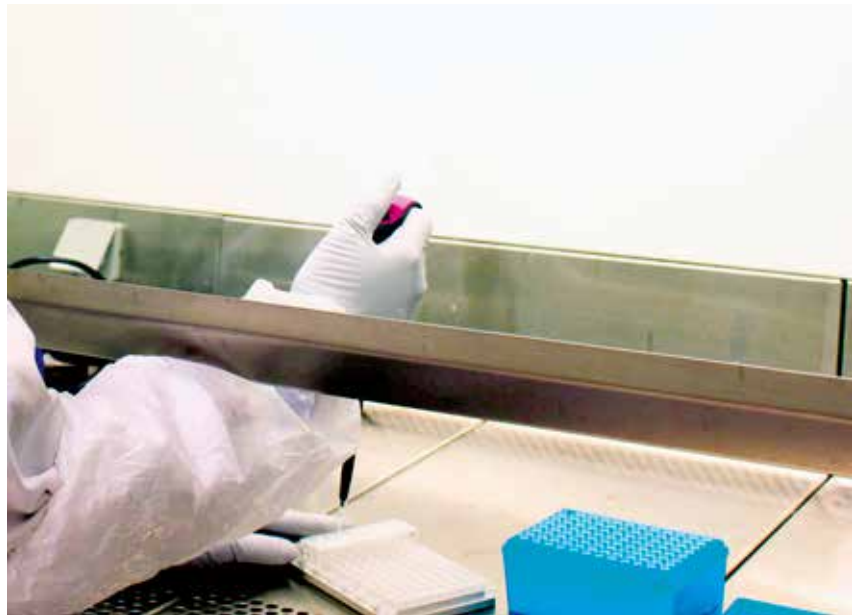
Arbete med botulinumtoxin vid Statens veterinärmedicinska anstalt

SVA är ett veterinärmedicinskt expert- och serviceorgan med uppdrag att övervaka och utveckla kunskap om smittsamma djursjukdomar, zoonoser och farliga ämnen. SVA ska även utveckla och utföra diagnostik av smittämnen och risksubstanser, ett uppdrag som kopplar till nedanstående rubrik från en svensk kvällstidning: *Tvåbarnsmamma akut sjuk – av rökt sik.*

Det här är bakgrunden: En kvinna från Östergötland hade insjuknat efter att ha ätit varmrökt sik under midsommarfirandet. I slutet av helgen blev hennes tillstånd så allvarligt att hon fick placeras i respirator. Analyser av kvinnans blod och resterna av siken visade på förekomst av det starka giftet botulinumtoxin. Kvinnan hade drabbats av botulism. Det är en mycket allvarlig sjukdom som kan drabba både människor och djur. Den orsakas av botulinumtoxiner, som bland annat bildas av bakterien *Clostridium botulinum*.

Eftersom mycket små mängder av giftet framkallar sjukdom krävs väldigt känsliga analystekniker för att hitta giftet i kroppsvätskor. Den metod som traditionellt används i världen är etiskt ifrågasatt och tidsödande: Provet som ska analyseras sprutas in i möss. Utvecklar mössen symptom på sjukdom kan man fastställa att provet innehöll botulinumtoxin.

SVA har sedan år 2006 arbetat med att utveckla en instrumentell (djurförsöksfri) metod för analys av botulinumtoxiner. Detta i samarbete med en grupp vid Centers for



Här bereds prover i en säkerhetsbänk vid SVA, inför analys i en masspektrometer.

Foto: Karin Nilsson, SVA

Disease Control and Prevention (CDC) i Atlanta, motsvarigheten till Folkhälsomyndigheten i Sverige. Metoden bygger på masspektrometri och kallas Endopep-MS.

PROJEKTMÅL

Målet för delprojektet vid SVA var att sätta upp och funktionstesta (validera) metoden Endopep-MS för att spåra aktiva botulinumtoxiner.

Botulinumtoxinerna delas upp i sju olika grupper, så kallade serotyper (A-G) beroende på hur de verkar. Dessa grupper kan därefter delas in i en eller flera undergrupper (subtyper) beroende på hur toxinernas aminosyrasekvenser ser ut.

Ett projektmål var också att skapa en databas med de olika subtyperna

av botulinumtoxiner. Skillnaderna i deras sammansättning kan användas för att underlätta smittspårning, det vill säga finna samband mellan specifika sjukdomsfall och en misstänkt smittkälla på samma sätt som fingeravtryck kan jämföras med varandra. När botulinumtoxiner har orsakat sjukdom kan det vara viktigt att spåra källan, oavsett om det handlar om avsiktlig eller oavsiktlig spridning av giftet.

RESULTAT OCH NYTTA

Inom ramen för projektet har SVA utrustat ett laboratorium lämpat för arbete med Endopep-MS-metoden för de mycket giftiga botulinumtoxinerna. De olika delarna i Endopep-MS-metoden har i tur och ordning optimerats på SVA. Därefter har den

funktionstestats för toxintyperna A, B, E och F som framförallt framkallar sjukdom hos människor och C, D samt blandformerna C/D och D/C, som främst förknippas med botulism hos djur.

Metodens tillförlitlighet utvärderades i en provningsjämförelse inom EU-projektet EQUATox. Laboratorier som deltog i projektet analyserade identiska prover med olika metoder och sedan jämfördes analysresultaten. I provningsjämförelsen (www.equatox.net) rapporterade SVA rätt svar med den nya metoden för alla prover. Det var ett viktig blindtest av metodens prestanda. Värdefulla kontakter kunde dessutom knytas med andra laboratorier som också jobbar med toxiner.

Metoden är tagen i bruk som en rutinmetod på SVA för analys av blodprover. Därmed finns nu förmågan att detektera och bestämma typen av botulinumtoxin under loppet av en arbetsdag, helt utan att använda försöksdjur. Detta kommer att ha stor betydelse om ett stort antal prover behöver analyseras framöver. Att metoden är snabb är också av stor betydelse eftersom botulism är en så allvarlig sjukdom.

Under projektet har etablering av ett arbetssätt för smittspårning startat och en databas har byggts upp som referensbibliotek så att undergrupper snabbt ska kunna identifieras. Med denna information kan man till exempel spåra källan till spridningen av giftet eller ta reda på om olika fall hänger samman med varandra.

Eftersom laboratoriet för EndopepMS-metoden även kommer att kunna användas till andra toxiner framöver har SVA:s generella förmåga att hantera mycket giftiga ämnen ökat betydligt.

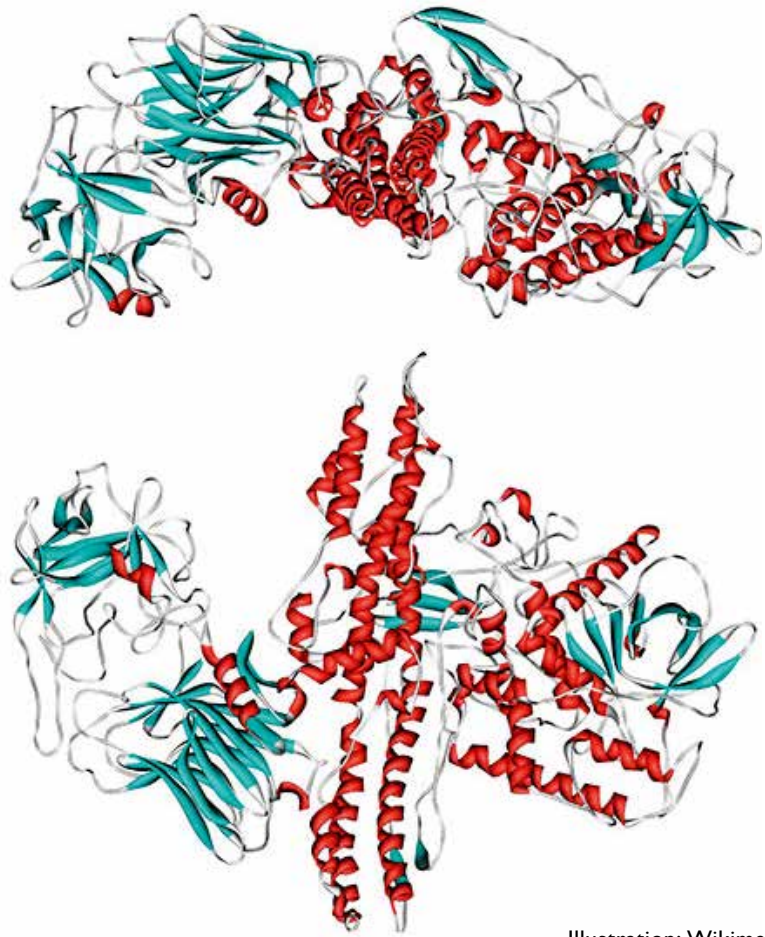


Illustration: Wikimedia
Public Domain

Kristallstrukturen i botulinumtoxin,
en substans som innehåller stora molekyler.

SLUTSATSER

SVA har under projektperioden avsevärt förbättrat sin förmåga att snabbt detektera botulinumtoxiner i biologiska prover. Både toxinets grupper och undergrupper kan påvisas med de nya metoderna. Den kompetens och utrustning som nu finns på myndigheten är en viktig resurs för landet vid en krissituation.

Det nära samarbetet kring avancerad kemisk analys av mycket giftiga ämnen som har inletts mellan myndigheterna i detta projekt bedöms också ge en värdefull plattform, både för kommande utvecklingsarbete och för hantering av oönskade händelser i framtiden.

Arbete med botulinumtoxin, saxitoxin och mjältbrandstoxin vid Totalförsvarets forskningsinstitut

FOI forskar om skydd mot hotämnen med koppling till kemisk och biologisk krigsföring samt terroristakter och kriminalitet. Att utveckla metoder för en fördjupad kemisk analys av sådana ämnen är en viktig uppgift. Detta projekt har omfattat ämnen som alla är svåra att mäta på ett enkelt och tillförlitligt sätt; botulinumtoxin, saxitoxin och mjältbrandstoxin (antraxtoxin), några av de mest akuttoxiska kemiska ämnen som finns.

Botulinumtoxin produceras av *Clostridium*-bakterier och giftverkan visar sig i form av att andningen förlamas. Saxitoxiner produceras naturligt av vissa typer av alger. Konsumtion av skaldjur (till exempel musslor och ostron) där toxinet har ackumulerats kan orsaka paralytisk skaldjursförgiftning, ett tillstånd där neurologiska symptom dominerar. Allvarlig förgiftning kan resultera i förlamning och andningssvårigheter, och utgången kan vara dödlig.

Sjukdomen mjältbrand, även kallad antrax, orsakas av den sporbildande bakterien *Bacillus anthracis*. Mjältbrandstoxin orsakar lokal vävnadsdöd, med en efterföljande blodförgiftning som kan vara livshotande. Mjältbrand är en av de äldsta infektionssjukdomar som människan känner till. Det är en mycket smittsam åkomma, med ett akut förlopp som främst drabbar idisslare. Men majoriteten av alla däggdjur inklusive människan kan infekteras.



Foto: FOI

FOI har under projektet arbetat med att etablera säkra metoder för hantering och upparbetning av toxinprover.

PROJEKTMÅL

Målet för delprojektet vid FOI var att utveckla metoder för rättsrelaterad (forensisk) kemisk analys av ovan nämnda tre toxiner, med hjälp av masspektrometri. Att etablera säkra metoder för hantering och upparbetning av toxinprover inför analys var

också ett projektmål, liksom att testa de nya metoderna genom att delta i EU-projektet EQUATox (www.equatox.net). Förmågan hos europeiska laboratorier att analysera utvalda toxiner undersöktes i projektet genom laboratoriejämförelser.

RESULTAT OCH NYTTA

FOI har inom projektet tagit fram nya analysmetoder för de aktuella toxinerna och också utvecklat metoder för att rena och koncentrera toxinerna ur komplexa material, som förberedelse för den instrumentella analysen.

Botulinumtoxin

Provupparbetnings- och analysmetoder har tagits fram för två varianter av botulinumtoxin, för grupperna A och B som är giftiga för människor. Den metod för upparbetning som tagits fram gör det möjligt att göra analyser på komplexa provmaterial, exempelvis mat. Upparbetningsmetoderna är baserade på toxinets sockerbindande egenskaper.

En förbättrad metod för klyvning och analys av toxinet har också utvecklats inom projektet. Botulinumtoxinet består av stora proteiner, de måste klyvas till mindre delar för att kunna analyseras med masspektrometriska metoder.

Slutligen har den sammanlagda kompetensen utnyttjats inom EQUATox för att karaktärisera det toxinmaterial som användes för att bereda prover till laborietesterna. FOI deltog därefter även i testet.

Saxitoxin

För saxitoxin och relaterade algtoxiner har FOI utarbetat en metod där dessa ämnen kan renas fram från svåra provtyper utan att toxiner omvandlas under processen. Detta är en förbättring jämfört med befintliga metoder. Möjligheterna att jämföra prover för att spåra ursprunget till en förgiftning har förbättrats. Med de äldre metoderna förloras en mängd information som har betydelse för provjämförelser och källspårning.



Provberedning i dragskåp.

Foto: FOI

En masspektrometrisk metod för att analysera proverna har också utarbetats. Denna utvärderades med godkänt resultat i laborietestet EQUATox (www.equatox.net).

Mjältbrandstoxin

Metoder för att analysera mjältbrandstoxin och ödemfaktorn – proteiner som produceras i samband med infektion av mjältbrandsbakterier – har etablerats vid FOI. För att möjliggöra analyser av mycket små mängder av dessa proteiner

har en uppreningsmetod baserad på bindande antikroppar använts.



Foto: FOI

Vid beredningen av prover används särskilda tillsatsämnen.

SLUTSATSER

FOI har genom projektet avsevärt förbättrat sin förmåga att lösa svåra analysfrågeställningar kring komplexa prover med innehåll av toxinerna saxitoxin, botulinumtoxin och mjältbrandstoxin. Fokus har legat på att bygga upp förmåga till analys av prover som är relevanta i en brottsrelaterad utredning. Den förvärvade kunskapen att analysera toxinprover kan även användas i samband med olyckor och andra krissituationer.

Arbete med enterotoxin och cereulid vid Livsmedelsverket

Livsmedelsverket arbetar aktivt för säkra livsmedel för konsumenten och för ärlighet och redlighet i livsmedelshandlingen. Mycket av detta arbete sker genom regelbunden kontrollverksamhet, men en annan viktig del av verksamheten är krisberedskap.

God krisberedskap kan till exempel betyda förmåga att snabbt hitta källan vid ett matförgiftningsutbrott så att utbrottets omfattning kan begränsas. För att utreda orsaker till matförgiftningsfall krävs tillgång till snabba och säkra analysmetoder. I detta projekt har två beredskaps-

metoder tagits fram, en för analys av enterotoxiner i livsmedel och en för analys av cereulid i pasta och ris. Både enterotoxiner och cereulid är vanliga orsaker till matförgiftningar. Därför är det viktigt att det finns analysmetoder som gör det möjligt att mäta deras närvaro i livsmedel.

Enterotoxiner

Enterotoxiner är en grupp värme-stabila gifter som bildas av bakterien *Staphylococcus aureus*. Denna bakterie finns naturligt i en del av befolkningen och kan överföras till livsmedel vid bristfällig hygien i

handlingen. Det finns också en risk att livsmedel avsiktligt förgiftas med enterotoxiner i syfte att göra skada på samhället. Enterotoxiner finns därför med på internationella listan över biologiska vapen.

Cereulid

Cereulid är ett gift som produceras av bakterien *Bacillus cereus*. Bakterien kan växa och släppa ut sina gifter i stärkelserika livsmedel (ofta pasta och ris) om dessa förvaras på fel sätt. Cereulid är liksom enterotoxiner ett värmestabilt gift.



En masspektrometer av typen LC-MS/MS har använts i Livsmedelsverkets analyser.

Foto: Livsmedelsverket

PROJEKTMÅL

Målet för delprojektet vid Livsmedelsverket var att utveckla och funktionstesta kemiska analysmetoder för enterotoxiner och cereulid. Eftersom dessa bakterietoxiner är vanliga orsaker till matförgiftningar i världen behövs metoder som gör det möjligt att påvisa förekomst av dessa gifter i livsmedel.

Ett delmål vid utveckling av enterotoxinmetoden var också att kunna särskilja olika typer av enterotoxiner, vilket är viktigt då man ska utreda orsaken till ett oavsiktligt eller avsiktligt förgiftningsutbrott. Metoden är inte i första hand avsedd att användas för rutinkontroll av livsmedel utan ska fungera som en beredskapsmetod som man kan använda vid misstanke om att enterotoxiner ligger bakom ett utbrott.

RESULTAT OCH NYTTA

Enterotoxinmetoden har testats genom tillsatsförsök på två livsmedelstyper: räkor och mjölk. Tillsatsförsök innebär att testet görs med en känd halt enterotoxin. Kan motsvarande mängd sedan påvisas indikerar detta att den använda analysmetoden är relevant och tillförlitlig.

Genomförda tester har visat att metoden fungerar bra och att det går att detektera små mängder enterotoxin. Två olika typer av enterotoxiner har undersökts och det har visat sig att det går att särskilja dessa från varandra. Metoden har potential att kunna detektera och särskilja mellan ytterligare varianter.

Metoden har inte testats i skarpt läge då inga kända, stora matförgiftningsutbrott orsakade av enterotoxiner inträffat i Sverige under

projekttiden. Metoden är dock klar att använda om ett sådant utbrott skulle ske.

Den nya metoden för analys av cereulid i kokt ris och pasta har även den testats genom tillsatsförsök. Ett stort antal autentiska matprover användes för att säkerställa att metoden ger stabila resultat och är känslig nog för att ge tillförlitliga besked om innehåll av giftiga nivåer av cereulid i ett livsmedel.

SLUTSATSER

Metoden som arbetats fram i detta projekt fungerar bra för att påvisa närvaro av enterotoxiner i räkor och mjölk. Man skulle sannolikt kunna undersöka fler livsmedelstyper utan att några större metodförändringar behöver göras. Den nya analysmetoden för cereulid kan detektera och mäta giftiga halter i livsmedel. Metoden är snabb och enkel.

Med dessa nya metoder har Sveriges förmåga att hantera förgiftningsutbrott till följd av enterotoxiner eller cereulid avsevärt stärkts. Även de toxiner och analysmetoder som andra myndigheter inom projektet arbetat med har relevans för livsmedel och dricksvatten. Sammantaget har projektet lett till att krisberedskapen inom Livsmedelsverkets ansvarsområde klart förbättrats.



Koncentrerade mjölkprover i väntan på upprensning och slutlig analys med masspektrometer.

Foto: Livsmedelsverket



Foto: SKL

Spice består av syntetiska cannabinoider som blandats med små mängder växtmaterial och säljs ofta i små färgglada påsar med några gram preparerat växtmaterial.

Arbete med cannabinoider och katinoner vid Statens kriminaltekniska laboratorium

En viktig uppgift för Statens kriminaltekniska laboratorium (Nationellt forensiskt centrum från årsskiftet 2014/2015) är att utföra undersökningar i brottmål åt rättsväsendets myndigheter.

Bruket av nya syntetiska droger, så kallade internetdroger, är ett växande samhällsproblem. Illegal framställning har under de senaste åren drastiskt förändrat vilka droger som missbrukas. Dessa nya substanser är ofta syntetiska varianter av tidigare kända växtsubstanser, till exempel tetrahydrocannabinol (THC) eller katinon. Båda har ett naturligt ursprung som växttoxiner.

De nya drogerna tillverkas nästan uteslutande utomlands och kan med lätthet beställas via internet. När en ny drog introduceras på marknaden kan den saluföras som laglig tills den har upptagits i en reglerande förteckning. Nya substanser införs ständigt i dessa förteckningar, vilket

snabbt driver på framställningen av andra nya, potenta droger.

Utvecklingen går så fort att det råder ständig brist på kommersiella referenssubstanser, vilket gör det svårt för myndigheterna att identifiera och utveckla analysmetoder för de nya drogerna. Två stora och nu aktuella grupper av missbrukssubstanser är syntetiska cannabinoider och syntetiska katinoner.

Syntetiska cannabinoider

Läkemedelsindustrins arbete med att utveckla nya läkemedel, inte minst sådana som ger smärtlindring, har resulterat i att det tagits fram många nya substanser som potentiella läkemedelskandidater. Utgångspunkten har bland annat varit att efterlikna vissa av effekterna hos tetrahydrocannabinol (THC), vilken är en av de aktiva toxiner i växt drogerna cannabis och hasch.

De flesta av dessa framtagna

substanser uppvisar olika grad av psykoaktiva effekter. Genom att göra mindre kemiska förändringar på molekylnivå kan hundratals nya varianter skapas. Dessa ämnen benämns syntetiska cannabinoider och en del av dem har kommit att bli alternativ till cannabis. Toxiciteten är oftast okänd, vilket medför stora risker för missbrukaren.

Syntetiska cannabinoider blandas vanligen med ett växtmaterial och brukar då kallas spice. I genomsnitt upptäcks och strukturutreds en ny syntetisk cannabinoid varannan vecka vid SKL.

Syntetiska katinoner

Grundtoxinet för gruppen syntetiska katinoner är det rusbringande ämnet katinon som tillsammans med katin utgör de aktiva substanserna i växt drogen kat. Även inom denna grupp förekommer många syntetiska varianter med olika grad av, eller okänd toxicitet.

PROJEKTMÅL

Målet med delprojektet vid Statens kriminaltekniska laboratorium har varit att framställa ett antal syntetiska cannabinoider och syntetiska katinoner för att sedan utveckla analysmetoder för dem.

Ett delmål har också varit att genom myndighetssamarbete ha ett utbyte av framtagna referenssubstanser och lägga in dessa i den egna referensdatabasen. Att utbyta kunskap och utnyttja andra myndigheters laboratorieresurser har också varit ett mål.

RESULTAT OCH NYTTA

Projektet har resulterat i en metod för att försöka förutspå vilka syntetiska varianter av växttoxiner som kan förväntas komma på den illegala drogmarknaden. Det har förstärkt beredskapen och möjligheterna att upptäcka de mest potentiella CBRN-ämnena inom drogområdet.

Baserat på den framtagna metoden har också strategier för kemisk framställning av syntetiska cannabinoider tagits fram. Två utvalda grundstrukturer och fyra slutprodukter har framställts i samarbete med Totalförsvarets forskningsinstitut i Umeå. Härigenom har även kompetensen kring framställningen av syntetiska cannabinoider stärkts.

Från grundstrukturerna krävs bara ett framställningssteg fram till färdig substans. Detta är en viktig utgångspunkt för den framtagna strategin. Genom att skapa nästan färdiga substanser kan referenssubstanser snabbt tillverkas vid behov.

De framtagna substanserna har analyserats med ett flertal förekommande tekniker. Resultaten har utvärderats för att ge en kunskap om hur och med vilken säkerhet det går att särskilja snarlika varianter.

Varianter av syntetiska katinoner har framställts, analyserats och utvärderats på motsvarande sätt. De framtagna substanserna har även lagts till i laboratoriets referensdatabibliotek.

Vid flera tillfällen under projekt-tiden har det i den ordinarie ärendeverksamheten förekommit materialtyper där detektionen med befintlig standardmetodik varit begränsad. Dessa fall har tagits om hand inom projektet för att kunna identifiera framtida behov av metodutveckling med inriktning mot CBRN-händelser. Framförallt gäller det fall

där substanserna förekommer i låga koncentrationer tillsammans med störande ämnen.

Kunskapsutbytet mellan de deltagande myndigheterna i samband med projektets workshops har varit utvecklande. Bland annat har detta resulterat i en ny beräkningsmodell för beredning av syntetiska cannabinoider (spice). Den har inför-livats i den rutinemässiga ärendehandläggningen. Genom projektet har även samutnyttjandet av vissa instrumentresurser och samarbetet mellan SKL och Rättsmedicinalverket stärkts.

SLUTSATSER

Förmågan att analysera, upptäcka och identifiera nya syntetiska droger som har sitt ursprung från växttoxiner har kraftigt stärkts genom detta projekt liksom beredskapen för en eventuell CBRN-händelse med sådana substanser.

Mycket värdefulla kontaktytor har etablerats mellan deltagande myndigheter vad gäller utbyte av erfarenheter inom det teoretiska såväl som inom det praktiska området.



Exempel på utrustning som kan användas vid beredning av spice i mindre skala.

Foto: SKL



Arbete med flexibla analysmetoder för droger vid Rättsmedicinalverket

Rättsmedicinalverkets uppgift är att tillhandahålla expertkompetens inom det rättsmedicinska området, för att hjälpa domstolar, åklagare och polis att förstå omständigheter i olika rättsfall. Bland annat förfogar Rättsmedicinalverket över Sveriges enda rättskemiska laboratorium, med uppdraget att utföra analyser av alkohol, narkotika, läkemedel och gifter i biologiskt material, till exempel blod och urin.

Bruket av nya, designade droger - så kallade internetdroger - har, som beskrivits tidigare, blivit ett växande samhällsproblem med såväl ökat missbruk som ett ökat antal förgiftningsfall som följd. Förmågan att klassa nya substanser som narkotika eller hälsofarlig vara har snabbats upp, men är fortfarande en tidskrävande process med flera myndigheter inblandade. När en substans väl klassats minskar förekomsten ofta drastiskt eller försvinner helt.

Begäran om analys av internetdroger kommer till Rättsmedicinalverkets avdelning för rättsgenetik och rättskemi från såväl polis och kriminalvård som från Rättsmedicinalverkets obduktionsverksamhet. Dessa förfrågningar kan gälla utredningar kring eget bruk av narkotika, drograttfylleri, eventuella förgiftningar eller dödsfall. Laboratoriet får främst in provmaterial i form av urin eller blod. Valet av provmaterial beror dels på det lagrum som finns för provtagning och dels på vilket material som är möjligt att inhämta.

En utmaning för laboratoriet är att kunna möta behovet av en ständig



Arbete med provmaterial vid Rättsmedicinalverkets laboratorium.

Foto: RMV

och snabb förändring av analysmetoderna för att hitta spårämngder av nya, tidigare okända substanser och

deras förväntade nerbrytningsprodukter i de komplexa provmaterial som urin och blod utgör.

Utveckling av nya metoder är tidskrävande. För att säkerställa analysernas kvalitet krävs dessutom ett omfattande valideringsarbete som kan ta flera månader.

PROJEKTMÅL

Målet med delprojektet vid Rättsmedicinska laboratoriet har varit att utveckla flexibla analysmetoder baserade på den senaste och mest sofistikerade analystekniken. Eftersom tidigare okända kemiska ämnen dyker upp regelbundet krävs förmåga till snabba förändringar och uppdatering av metoderna.

Fokus har legat på att utveckla nya, unika metoder anpassade för analys av katinoner, fenetylaminer, piperaziner och andra vanligt förekommande internetdroger i urin respektive blod, samt att utveckla metoder särskilt anpassade för analys av syntetiska cannabinoider och deras omvandlingsprodukter. Ett delmål har även varit att bygga upp referensdatabaser för dessa ämnen.

RESULTAT OCH NYTTA

Genom att sätta av avsevärda resurser för metodutveckling och arbeta på ett systematiskt sätt i projektform har laboratoriet på kort tid kunnat införa flera nya metoder med UHPLC-QTOF MS för analys av urin och blodprover, det vill säga tekniker som bygger på högupplösande masspektrometri (MS) så kallad "Quadrupole Time-of-Flight tandem MS" (QTOF-MS) i kombination högupplösande vätskekromatografi (UHPLC).

Tekniken skiljer sig från annan tidigare använd analysteknik genom att man vid analys kan samla stora mängder data som i efterhand går att bearbeta och analysera. Med hjälp av

egna, uppbyggda referensdatabaser kan ett stort antal olika substanser identifieras i ett och samma prov.

De databaser och bibliotek som upprättats innehåller för tillfället mer än 100 olika syntetiska cannabinoider, ett 50-tal metaboliter till dessa samt närmare 150 olika katinoner, fenetylaminer, piperaziner och andra nu vanligt förekommande internetdroger. Samtliga metoder har börjat användas i rutinverksamheten, men även för olika forskningsprojekt. Bland annat har projekt påbörjats för att kartlägga metabolismen för nya substanser genom studier med hjälp av humana levermikrosomer, djurmodeller och humana fall.

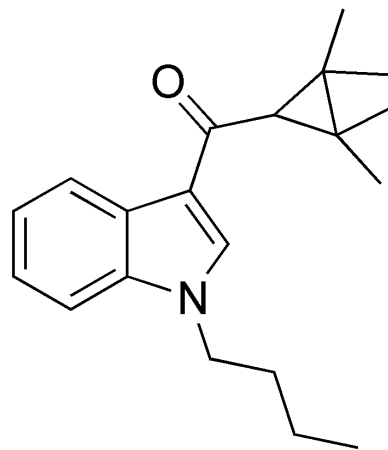
Efter begäran från framförallt polis och kriminalvård under ett års tid har mer än 5 500 urinprover och 2 000 blodprover analyserats för internetdroger och deras metaboliter, (syntetiska cannabinoider undantagna). I dessa prover har frekvensen positiva fynd i genomsnitt varit 21 procent. 51 olika internetdroger har identifierats.

Närmare 10 000 urinprover har analyserats för metaboliter av syntetiska cannabinoider. Här har frekvensen positiva fynd varit låg, i snitt tre procent. Detta beror på metodens begränsningar: de nya substansernas metabolism är ofta okänd och det saknas referensmaterial för många metaboliter.

Frekvensen positiva fynd har däremot varit 22 procent i de mer än 800 analyser som gjorts för intakta syntetiska cannabinoider i blod under fyra månader. Här dominerar fynden av ett tiotal substanser. AB-FUBINACA står just nu för mer än hälften av dessa fynd. En rad individer har kunnat lagföras för brott och bruket av nya droger har kunnat återrapporteras till andra myndigheter.

Resultat från projektet har presenterats såväl i vetenskapliga publikationer som vid möten och konferenser. Nya rutiner har utvecklats för kontinuerlig uppdatering och vidareutveckling av de nya metoderna. Detta arbete kommer dock fortsatt vara resurskrävande.

Illustration: SKL



Exempel på kemisk struktur i en syntetisk cannabinoid.

SLUTSATSER

Genom teknikskifte till UHPLC-QTOF MS har beredskapen och förmågan att analysera nya internetdroger ökat avsevärt. Laboratoriet är härmed ett av världens ledande toxikologiska laboratorier i analys och rapportering av nya internetdroger.

KONTAKTPERSONER

Vill du veta mer om hur de olika myndigheterna arbetat i projektet Kemisk analys av toxiner kan du vända dig till nedanstående kontaktpersoner:

Statens veterinärmedicinska anstalt, Ulf Bondesson:
ulf.bondesson@sva.se

Totalförsvarets forskningsinstitut, Crister Åstot:
astot@foi.se

Livsmedelsverket, Karl-Erik Hellenäs:
karl-erik.hellenas@slv.se

Statens kriminaltekniska laboratorium, Per Lundquist:
per.lundquist@polisen.se

Rättsmedicinalverket, Martin Josefsson:
martin.josefsson@rmv.se